

牛十二指腸中のセクレチンの検索

蓮 池 啓 子*

A Research for Duodenal Secretin of Cow.

Keiko Hasuike

緒 言

腸上部の粘膜にはいろいろのホルモンの存在が認められている。Secretin はその一つで腸上部の粘膜にあり、膵液の分泌を促すホルモンである。

19世紀の末、Bakker および Dolinski が十二指腸粘膜へ酸を与えると、膵液の分泌が増すことを観察し、1902年 Bayliss, Starling らは、膵液の分泌に対してホルモン説を称えた。この Secretin を単離するため多数の試みがなされてきた。1933年 Hammarsten および Ågren ならびに1938年 Greengard¹⁾ および Ivy は Secretin を高純度の結晶性ピクリン酸塩として得ており、その化学的組成の一部が明らかにされている。Hammarsten³⁾ らは超遠心法により、分子量約 5000、かつポリペプチドであると述べており、窒素含有量については、Takacs は15%、岸田氏⁴⁾は13.6%、Ågren⁵⁾ らによると12.3%と報告している。また1952年 Max Krup⁶⁾ らはアミノ酸組成についてペーパークロマトグラフィーにより15のアミノ酸と2つの不明のアミノ酸を報告している。又 Hammarsten⁷⁾ らは硫黄を含むことを認めており、岸田氏によると硫酸基として存在しているとしている。また最近1961年 J. E. Jorpes, V. Mutt⁸⁾ らは向流分配法により、より活性を有する Secretin を得たと報告している。本実験では、1952年 Leon. L. Gerohebein, Max Krup⁸⁾ らにより報告されたセクレチン濃縮物の分離と、その化学的組成について検索を行なった。

実 験 の 部

I 試 料

京都市営屠畜場にて、屠殺後40分以内の牛の十二指

腸について、腸内粘着物を除去し、5 cmの長さに切ったもの60kgを試料とする。

II 抽 出

上記の牛の十二指腸60kgを、0.4% 塩酸で冷却しながら2時間抽出する。

抽出液から大きな粒子を除くため木綿で濾過し、その濾液に多量の食塩を加え析出した沈殿物を95%アルコールで抽出し、アセトンで再沈殿させる。これを洗滌、乾燥したものに6.1 Nトリクロール酢酸を加え3日間冷却し、沈殿を酸性水溶液中で溶解し、再蒸留アニリンを含むアセトンを加え、遠心分離し、上澄液を冷却し、析出した沈殿を除去し、濾液からアセトンとアニリンを除去し、析出した褐色の沈殿を濾別し、濾液にアセトンを添加し、24時間冷却すると透明な粗結晶が析出する。これにピクリン酸を含むアセトンを加え黄色の粉末を得た。濃塩酸2%を含む70%アセトンで数回精製し65mgの粉末を得た。

それはアセトンに不溶、冷純アルコールに難溶、酸性70%アルコールに易溶、水に易溶であった。

III 本物質の紫外線吸収スペクトルの測定

試料2.5mgを5 mlの蒸留水に溶解したものを検液とし、島津SV50A型自記光電分光光度計により、紫外線吸収スペクトルの測定を行ない、図1、表1の結果を得た。

表1 検液の紫外部における吸収極大値

	吸 収 極 大 値
検 液	276.5
文 献 値	275~278

* 本学調理研究室

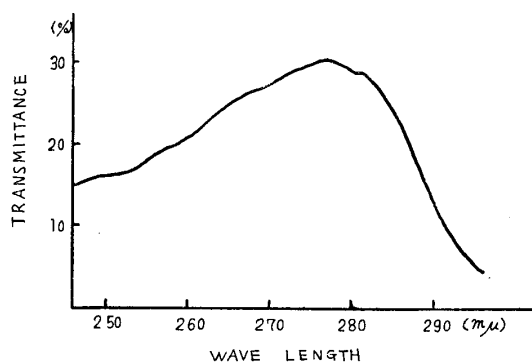


図1 紫外線吸収スペクトル

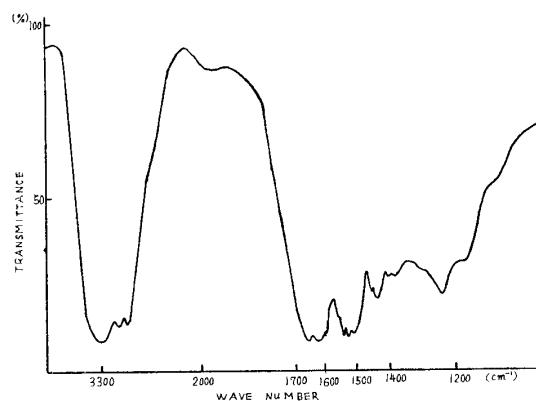


図3 赤外線吸収スペクトル

IV 電気泳動の測定

I 泳動法：ディスクの電気泳動法

装置：エスエス機器製ディスク

電気泳動装置8型

試料量：500μgの試料

使用ゲル：pH 9.4 用ゲル

電気泳動時の電流：ゲル1本当り 5mA

泳動時間：1時間

染色：アミドブラック

脱染色時の電流：ゲル1本当り 8~10mA

泳動時間：1時間30分

II 結果

図2に示すような1本の濃く太いバンドと2本の淡いバンドを認めた。



図2 本物質の電気泳動像

V 赤外線吸収スペクトルの測定

KBr錠剤法により赤外線吸収スペクトルの測定を行った結果図3に示すようにポリペプチドの特性吸収帯 1240cm^{-1} $1530\sim 1560\text{cm}^{-1}$ $1630\sim 1660\text{cm}^{-1}$ 3300cm^{-1} を認めた。

以上の結果から本物質はポリペプチドであると認められる。なおペーパークロマトグラフィーによる検索の結果遊離のアミノ酸の存在は認められなかった。

VI 窒素の定量

マイクロケルダール法により窒素の定量を行なった結果12.5%であった。

VII アミノ酸組成

試料10.0mgを6 N共沸塩酸に溶解し封管中で 110°C 24時間および72時間加水分解して分解し、減圧アルカリデシケーター中で乾固し、pH 2.2の希釈用ク

表2 アミノ酸組成

アミノ酸	24hr. $\mu\text{mol}/1\text{g}$ Secretin	72hr. $\mu\text{mol}/1\text{g}$ Secretin	蛋白質 100 g 中のアミノ酸 残基に対する g 数
Lys	540	600	7.75
His	200	220	3.04
NH ₃	580	780	
Arg	480	320	7.55
Asp	640	780	9.06
Thr	300	260	2.82
Ser	320	340	3.00
Glu	640	700	9.11
Pro	440	400	4.32
Gly	540	500	3.14
Ala	560	560	4.04
Cys	30	20	0.67
Val	400	440	4.41
Met	140	140	1.85
Ileu	320	380	4.34
Leu	620	680	7.76
Tyr	240	220	3.94
Phe	140	140	2.07
Total			78.87

エン酸緩衝液で 10ml に定容し、その内の 0.5ml を KLA-3B 形日立アミノ酸自動分析計により分析した。なおシスチンは過ギ酸酸化法によりシスチン酸として定量した。そしてそれぞれのアミノ酸の大きい値を取った時の蛋白質 100 g 中のアミノ酸残基に対するグラム数は表 2 の如くである。

総 括

- I Leon. L. Gerohbein, MaxKrup により報告された方法により Secretin 濃縮物の分離を行ないペーパークロストグラフィー、紫外線吸収スペクトル、電気泳動法により、遊離のアミノ酸を含まないポリプチドであることを認めた。
- II 本物質を加水分解し、日立アミノ酸自動分析計によりアミノ酸分析を行なった結果、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、スレオニン、セリン、グルタミン酸、プロリン、グリミン、アラニン、シスチン、バリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニールアラニンの 17

種のアミノ酸を測定した。

最後に終始御指導を賜りました工藤豊博士に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) E. Hammarsten, E. Jorpes, G. Ågren : *Biochem. Z.*, **264**, 272 (1933).
- 2) H. Greengard, A. C. Ivy : *Am. J. Physiol. L.*, **124** 427 (1938).
- 3) G. Ågren, E. Hammarsten : *J. Physiol.*, **90**, 330 (1937).
- 4) L. Takacs : *Z. ges. exp. Med.*, **60**, 424 (1928).
- 5) 岸田 : 歯科月報., **30** 1-13 (1956)
- 6) P. Edman, G. Ågren : *Arch. Biochem.*, **13**, 283 (1947).
- 7) J. E. Jorpes, V. Mutt : *Acta. Chem. Scand.*, **15**, 790 (1961).
- 8) L. L. Gerohbein, M. Krup : *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 679 (1952).